

ピラクロストロビン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

ピラクロストロビン

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

ピラクロストロビン標準品 本品はピラクロストロビン98%以上を含み、融点は60～65℃である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

(1) 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gに水20 mLを加え、2時間放置する。これにメタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に、メタノール50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、40℃以下で約20 mLまで濃縮する。これに5%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

この残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出する。アセトニトリル層を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液5 mLを加えて溶かす。

(2) 果実、野菜及びハーブの場合

試料20.0 gに、メタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に、メタノール50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、40℃以下で約20 mLまで濃縮する。これに5%塩化ナトリウム溶液200 mLを加え、*n*-ヘキサン100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液5 mLを加えて溶かす。

2) 精製

(1) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

クロマトグラフ管（内径15 mm）に、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル（粒径63～200 μm ）5 gを*n*-ヘキサンに懸濁させて充てんし、無水硫酸ナトリウム5 gを積層する。このカラムに、1）で得られた溶液を注入した後、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液45 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン及び*n*-ヘキサン（3：17）混液50 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液3 mLを加えて溶かす。

(2) エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）にアセトン、*n*-ヘキサン及びアセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに(1)で得られた溶液を注入した後、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液12 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び水（3：2）混液に溶解し、穀類、豆類及び種実類の場合は正確に4 mL、果実、野菜及びハーブの場合は正確に8 mLとしたものを、孔径0.45 μm のメンブランフィルターを用いてろ過し、試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ピラクロストロビン標準品の0.025～0.5 mg/Lアセトニトリル及び水（3：2）混液溶液を数点調製し、それぞれ20 μL をHPLCに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液20 μL をHPLCに注入し、5の検量線でピラクロストロビンの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

8. 測定条件

1) HPLC

検出器：UV（波長275 nm）

カラム：トリアコンチルシリル化シリカゲル（粒径5 μm ）、内径4.6 mm、長さ250 mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル、水及びメタノール（11：8：1）混液

保持時間の目安：21分

2) LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 μm ）、内径2～2.1 mm、長さ150 mm

カラム温度：40℃

移動相： アセトニトリル及び0.01%ギ酸溶液混液（1：1）から（3：2）までの濃度勾配を20分間で行い、さらに（9：1）で5分間送液する。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（ m/z ）：388

注入量：2 μ L

保持時間の目安：19分

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

ピラクロストロビンを試料からメタノールで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶する。果実、野菜及びハーブはそのまま、穀類、豆類及び種実類の場合はアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、シリカゲルカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムにより精製し、HPLC-UVで測定、LC/MSで確認する方法である。

2) 注意点

- (1) HPLC分析において、試料由来の妨害成分を除去できない場合は、LC/MSを用いて測定を行う。
- (2) エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムから妨害成分が溶出するため、あらかじめ、アセトン、*n*-ヘキサン及びアセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液各10 mLで洗浄して使用する。
- (3) 試料によって不溶物が残ることから、これを除去する目的でメンブランフィルターを使用する。

11. 参考文献

なし

12. 類型

C